

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/17893 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 31/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/09890
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
28. August 2001 (28.08.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
100 42 137.7 28. August 2000 (28.08.2000) DE
- (71) Anmelder und  
(72) Erfinder: **LANG, Florian** [DE/DE]; Physiologisches Institut I, Gmelinstrasse 5, 72076 Tübingen (DE).
- (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **COHEN, Philip** [GB/GB]; Dept. of Biochemistry, University of Dundee, Dow Street, Dundee DD1 5EH (GB). **FRIEDRICH, Björn** [DE/DE]; Med. Klinik u. Poliklinik, Abtl. Innere Medizin III, Otfried-Müller-Strasse 10, 72076 Tübingen (DE).
- (74) Anwalt: **RUFF, WILHELM, BEIER, DAUSTER & PARTNER**; Kronenstrasse 30, 70174 Stuttgart (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SGK2 AND SGK3 USED AS DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC TARGETS

(54) Bezeichnung: SGK2 UND SGK3 ALS DIAGNOSTISCHE UND THERAPEUTISCHE TARGETS

(57) Abstract: The invention relates to the use of a substance, which detects sgk2 and/or sgk3, for diagnosing diseases connected with a disturbance of ion channel activity, in particular, sodium and/or potassium channels. The invention also relates to the use of an active ingredient for treating the aforementioned diseases, said active ingredient influencing the expression and/or the function of sgk2 and/or sgk3 and regulating the elimination of Na<sup>+</sup> and/or K<sup>+</sup> as a result.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Substanz zum Nachweis von sgk2 und/oder sgk3 zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere Natrium- und/oder Kaliumkanälen, in Zusammenhang stehen. Weiterhin wird von der Erfindung die Verwendung eines Wirkstoffes zur Behandlung obiger Erkrankungen umfaßt, wobei der Wirkstoff die Expression und/oder Funktion von sgk2 und/oder sgk3 beeinflusst und dadurch die Na<sup>+</sup>-Ausscheidung und/oder K<sup>+</sup>-Ausscheidung reguliert.



WO 02/17893 A2

- 1 -

Beschreibung:

**sgk2 und sgk3 als diagnostische und therapeutische Targets**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Substanz zum diagnostischen Nachweis von sgk2 und/oder sgk3 (serum and glucocorticoid dependent kinase 2 and 3) sowie die Verwendung eines  
10 Wirkstoffs zur Beeinflussung von sgk2 und/oder sgk3 für die therapeutische Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere Natrium- und/oder Kaliumkanälen in Zusammenhang stehen. Die sgk sind eine Serin/Threonin Proteinkinase Familie, die transkriptionell und post-  
15 transkriptionell reguliert werden.

Eine Vielzahl von externen Signalen, denen eine Zelle in ihrer Umwelt ausgesetzt ist, führen zu intrazellulären Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungskaskaden, um eine schnelle und reversible  
20 Übertragung dieser Signale von der Plasmamembran und ihren Rezeptoren in das Zytoplasma und den Zellkern zu ermöglichen. Die Regulation einzelner Proteine, die an diesen Kaskaden beteiligt sind, ermöglicht erst die hohe Spezifität und Flexibilität der Zellen, die es ihnen erlauben, sehr schnell auf extrazelluläre Signale zu reagieren. An diesen  
25 Regulationsprozessen sind insbesondere Kinasen beteiligt. Die serum- und glucocorticoidabhängige Kinase (sgk) wurde ursprünglich aus Rattenmammarkarzinomazellen kloniert (Webster et al. 1993 a,b). Die humane Kinase hsgk wurde als zellvolumenreguliertes Gen aus Leberzellen kloniert (Waldegger et al. 1997). Es zeigte sich, daß die  
30 Rattenkinase (Chen et al. 1999, Náray-Fejes-Tóth et al. 1999) den epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanal (ENaC) stimuliert. Weiter wurde gezeigt, daß eine

- 2 -

gesteigerte Aktivität des ENaC mit Hypertonie einhergeht (Warnock 1998).

Die hsgk wird auch im Gehirn exprimiert (Waldegger et al. 1997). Dort  
5 spielen die spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle Kv1.3 eine entscheidende  
Rolle bei der Regulation der neuronalen Erregbarkeit (Pongs 1992).  
Kv1.3 spielt ferner eine wichtige Rolle in der Regulation von  
Zellproliferation (Cahalan and Chandy, 1997) und apoptotischem Zelltod  
(Szabo et al., 1996, Lang et al., 1999). Kv1.3 ist ferner wichtig bei der  
10 Regulation der Lymphozytenproliferation und -funktion (Cahalan and  
Chandy, 1997). Kürzlich wurden zwei weitere Mitglieder der sgk-Familie  
kloniert, die sgk2 und sgk3 (Kobayashi et al., 1999). Wie die sgk1,  
werden auch die sgk2 und sgk3 durch Insulin und IGF1 über den PI3  
Kinase-Weg aktiviert. Eine weitere Charakterisierung und funktionelle  
15 Zuordnung beider neuer Kinasen hat bis jetzt aber nicht stattgefunden.

Dementsprechend stellt sich die Erfindung die Aufgabe, die beiden  
Kinasen sgk2 und sgk3 für diagnostische und therapeutische  
Anwendungen nutzbar zu machen.

20

Überraschenderweise konnte in Experimenten mit der Zwei-Elektroden-  
Spannungsklemme gezeigt werden, daß Coexpression der hsgk2 oder  
der hsgk3 zu einer massiven Zunahme der Aktivität des epithelialen  
 $Na^+$ - Kanals (ENaC) führt. Der ENaC spielt eine entscheidende Rolle bei  
25 der renalen  $Na^+$ -Ausscheidung, die wiederum den Blutdruck beeinflusst.  
Die Kinase sgk3 wird auch im Gehirn exprimiert. In Experimenten mit  
der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme konnte auch gezeigt werden,  
daß die Coexpression der hsgk2 oder der hsgk3 zu einer Zunahme der  
Aktivität des  $K^+$ -Kanales Kv1.3 führt. Da die Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen  
30 zu einer Herabsetzung der neuronalen Erregbarkeit führt, zeigen die  
gefundenen funktionellen Daten, daß die Wirkungen der sgk3 geeignet  
sind, die Erregbarkeit von Neuronen zu reduzieren. Eine gestörte

- 3 -

Expression oder Funktion der sgk3 kann somit Ursache für das Auftreten epileptischer Anfälle sein. Umgekehrt ist der Schluss berechtigt, daß Stimulatoren der Expression oder Aktivität der sgk3, welche die Bluthirnschranke überschreiten, bei epileptischen Anfällen mit Erfolg  
5 eingesetzt werden können. Schließlich wurde gefunden, daß der im Herzen exprimierte K<sup>+</sup>-Kanal minK durch die sgk1, sgk2, sgk3 aktiviert wird. Damit spielen diese Kinasen eine Rolle bei der Regulation der kardialen Erregbarkeit.

10 Demzufolge wird die erfindungsgemäße Aufgabe durch den Gegenstand der unabhängigen Ansprüche 1, 2, 13 und 17 gelöst. Bevorzugte Ausführungen sind in den abhängigen Ansprüchen 3 bis 12, 14 bis 16 und 18 bis 23 genannt. Der Inhalt aller dieser Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

15

Erfindungsgemäß kann mindestens eine Substanz zum Nachweis der Expression und/oder der Funktion von sgk2 oder sgk3 in eukaryotischen Zellen verwendet werden. Damit ist insbesondere auch eine Diagnose von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Ionenkanälen,  
20 wie z. B. Natrium- und Kaliumkanälen in Zusammenhang stehen, möglich. Bei dieser Substanz könnte es sich z. B. um einen Antikörper handeln, der gegen sgk2 oder sgk3 gerichtet ist, und in einem dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren, wie z.B. ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) eingesetzt werden kann. Bei solchen  
25 Immunoassays wird der gegen das zu bestimmende Antigen (sgk2 und sgk3) gerichtete spezifische Antikörper (bzw. bei Antikörperbestimmungen homologe Testantigene) an eine Trägersubstanz (z.B. Zellulose, Polystyrol) gebunden, an der sich nach der Inkubation mit der Probe Immunkomplexe bilden. In einem nachfolgenden Schritt  
30 wird diesen Immunkomplexen ein markierter Antikörper zugeführt. Durch Zugabe eines chromogenen Substrates zum Reaktionsansatz können die Immunkomplex-gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar

- 4 -

gemacht bzw. die Antigenkonzentration in der Probe über eine photometrische Bestimmung der Immunkomplex-gebundenen Markerenzyme durch Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität ermittelt werden. Weitere Substanzen, die für den diagnostischen Nachweis verwendet werden können, sind sogenannte Oligonukleotide, die mit Hilfe der sogenannten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geeignet sind, über ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden, einen quantitativen Nachweis von *sgk2* und *sgk3* zu erbringen. Weitere Verfahren, wie ein bekanntes Zielprotein quantitativ nachgewiesen werden kann, sind dem Fachmann geläufig.

Erfindungsgemäß wird ein Wirkstoff für die Beeinflussung, insbesondere die Inhibierung oder Aktivierung der Expression und/oder Funktion von *sgk2* und *sgk3* in eukaryotischen Zellen, zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere Natrium und/oder Kalium-Kanälen in Zusammenhang stehen, beansprucht. Da es sich bei *sgk2* und *sgk3* um Kinasen handelt, kommen als Kinase-Inhibitoren bekannte Substanzen wie Staurosporin, Chelerythrin etc., aber auch andere Substanzen in Frage. Dem Fachmann sind solche Inhibitoren bekannt, und man kann sie teilweise kommerziell bei Firmen wie Sigma oder Merck beziehen. Als Aktivatoren können z. B. gentechnisch veränderte Mutanten von *sgk2* und/oder *sgk3* genutzt werden.

Erfindungsgemäß kann es sich bei dem Ionenkanal um einen Natrium-Kanal des ENaC-Subtypes handeln. Dabei wird durch die Inhibierung bzw. Aktivierung von *sgk2* und/oder *sgk3* vorzugsweise der  $\text{Na}^+$ -Transport durch diesen Kanal beeinflusst, der seinerseits beispielsweise den Blutdruck beeinflusst. Durch die Überexpression oder Überaktivität der *sgk2* und/oder der *sgk3* kommt es zu einer renalen Retention von  $\text{Na}^+$  und auf diese Weise zur Entwicklung von Hypertonie. Es ist somit

- 5 -

möglich, durch Aktivierung bzw. Inaktivierung der entsprechenden Kinasen den Blutdruck zu regulieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Ionenkanal um einen Kalium-Kanal des Kv1.3-Subtypes. Die Beeinflussung, insbesondere die Inhibierung oder Aktivierung von sgk2 und/oder sgk3 beeinflusst vorzugsweise den K<sup>+</sup>-Transport durch den Kalium-Kanal vom Kv1.3-Subtyp. Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei dem Ionenkanal um einen Kalium-Kanal des minK-Subtypes, wobei hier eine Beeinflussung von sgk1, sgk2 und/oder sgk3 den K<sup>+</sup>-Transport durch den Kalium-Kanal vom minK-Subtyp beeinflusst.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff gegen sgk2 und/oder sgk3 selbst gerichtet. Es kann sich dann bei den Wirkstoffen um Antisensesequenzen, sogenannte kinase deficient mutants, oder auch um Kinaseinhibitoren, wie Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. deren Analoga handeln. Auch sogenannte "small molecular compounds" bzw. Polynukleotide, welche für ein Peptid kodieren, welches die Expression von sgk2 und/oder sgk3 beeinflusst, können verwendet werden.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer von sgk2 und/oder sgk3 gerichtet. Diese Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer könnten up- und downstream liegende Mitglieder der sgk-Signaltransduktionskaskade, Transkriptionsfaktoren, die für den Expressionslevel von sgk2 und/oder sgk3 verantwortlich sind, aber auch bis jetzt unbekannte Moleküle sein, die durch den Wirkstoff beeinflusst werden und an der Expression und/oder Funktion von sgk2 und/oder sgk3 beteiligt sind.

- 6 -

Bei der Erfindung ist es möglich, bekannte sowie noch unbekannte Wirkstoffe zu verwenden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Wirkstoff eine sogenannte "small molecular compound", insbesondere eine solche mit einem Molekulargewicht (MG) < 1000. Bei dieser small molecular compound kann es sich auch um Kinase-Inhibitoren, wie die Imidazol-Derivate SB 203580 (MG 377,4) oder auch SB 202190 (MG 331,3) handeln, die beide bekannte Inhibitoren der Kinase-Expression sind und von Calbiochem, San Diego, CA, USA, kommerziell vertrieben werden.

10

Die Erfindung kann genutzt werden, um alle Formen von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Natrium- und/ oder Kaliumkanälen in Zusammenhang stehen, zu behandeln. Insbesondere ist hierbei an die arterielle Hypertonie, sowie ein dem sogenannten Liddle-Syndrom eine seltene genetisch bedingte Überaktivität des ENaC und somit eine Erkrankung mit massiver Steigerung des Blutdruckes entsprechendes Krankheitsbild zu denken.

Die durch die erfindungsgemäße Verwendung behandelbaren Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Kaliumkanälen, insbesondere des Kv1.3- bzw. des minK-Subtypes verbunden sind, umfassen nach derzeitiger Kenntnis die Erkrankungen Epilepsie, Neurodegeneration, Autoimmunerkrankungen sowie Immundefizienz. Störungen des minK-Kanales sind insbesondere Ursache von Herzhrythmusstörungen.

Die Erfindung betrifft auch einen Diagnosekit. Dieser umfaßt mindestens eine Substanz, die zum Nachweis von Expression und/oder Funktion von sgk2 und/oder sgk3 geeignet ist, zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere Natrium- und/oder Kaliumkanälen in Zusammenhang stehen. Weiterhin können mit einem solchen Kit Erkrankungen diagnostiziert werden, die

- 7 -

mit einer Über- oder Unterexpression bzw. -funktion von sgk2 und/oder sgk3 verbunden sind. Gezielt können solche Diagnostika in einem Diagnosekit eingesetzt werden, um Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Liddle-Syndrom, Epilepsie, Neurodegeneration, 5 Autoimmunerkrankungen und Immundefizienz nachzuweisen. Auch hierbei erfolgt der Nachweis der Erkrankungen über den Nachweis einer gestörten Expression und/oder Funktion von sgk2 und/oder sgk3.

Die Erfindung umfaßt ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, 10 die mindestens einen Wirkstoff enthält, der die Expression und/oder Funktion von sgk2 und/oder sgk3 beeinflusst, insbesondere inhibiert oder aktiviert, und vorzugsweise, ggf. einen pharmazeutischen Träger. Dabei kann es sich bei dem Wirkstoff um einen Kinase-Inhibitor, wie die bereits weiter oben erwähnten Inhibitoren Staurosporin, Chelerythrin, SB 15 203580 und SB 202190 bzw. deren Analoga, aber auch andere Substanzen, handeln. Bei dem Wirkstoff kann es sich ferner um ein Polynukleotid, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid kodiert, handeln, wobei dieses Peptid die Expression von sgk2 und/oder sgk3 beeinflusst, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert. Dieses Polypeptid 20 könnte zum Beispiel ein sogenannter "kinase deficient mutant" sein. Bei dem Wirkstoff kann es sich ferner um eine sogenannte "small molecular compound" handeln, vorzugsweise um small molecular compounds mit einem Molekulargewicht (MG) < 1000. Schließlich kann es sich bei dem Wirkstoff auch um eine sogenannte Antisensesequenz handeln, d.h. 25 eine Sequenz, die in der Lage ist, mit der mRNA eine Doppelstrangduplex auszubilden, und dadurch die Translation in ein Polypeptid zu verhindern. Auch könnte die Sequenz von sgk2 und sgk3 selbst genutzt werden, um eine Überexpression dieser Kinasen zu erzielen, z. B. durch Einbau von Vektoren mit starken Promotoren. Zu 30 weiteren Merkmalen einer solchen Zusammensetzung wird auf den entsprechenden bisherigen Text der Beschreibung Bezug genommen.



- 8 -

Schließlich umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine wirksame Menge mindestens eines Wirkstoffs aufweist, der die Expression und/oder Funktion von Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischen Vorläufern von sgk2 und/oder sgk3 beeinflusst, insbesondere inhibiert oder aktiviert. Vorzugsweise kann diese pharmazeutische Zusammensetzung ggf. auch einen pharmazeutischen Träger enthalten. Diese Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer von sgk2 und/oder sgk3 können z.B. weitere Kinasen sein, die an der Regulation der Aktivität von sgk2 und/oder sgk3 beteiligt sind, Transkriptionsfaktoren, die für den Expressionslevel von sgk2 und sgk3 verantwortlich sind, sowie weitere bekannte oder bis jetzt unbekannte Mitglieder der sgk2 und/oder sgk3 Signaltransduktionskaskade. Auch Polynukleotide, die ein Peptid kodieren, welches die Expression von Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischen Vorläufern von sgk2 und/oder sgk3 beeinflusst, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert, können in solchen Zusammensetzungen enthalten sein. Auch sogenannte small molecular compounds, die vorzugsweise ein Molekulargewicht (MG) von < 1000 haben, und die gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer von sgk2 und/oder sgk3 gerichtet sind, und dabei die Expression bzw. Funktion dieser Kinasen inhibieren oder aktivieren, sind einsetzbar.

Die bestehenden Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen in Verbindung mit den Unteransprüchen und den Figuren. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

In den Abbildungen zeigen:

Figur 1: Stimulation des  $\text{Na}^+$ -Kanals rENaC durch die hsgk2 und hsgk3.

5

Figur 2: Stimulation des  $\text{K}^+$ -Kanals Kv1.3 durch die hsgk2 und hsgk3.

Figur 3: Wirkung einer Hemmung des  $\text{K}^+$ -Kanals Kv1.3 auf das Überleben von HEK-Zellen (human embryonic kidney cells).

10

### **Material und Methoden**

15 Die Dissektion von *Xenopus laevis*, die Gewinnung und Behandlung der Oozyten wurde im Detail früher beschrieben (Busch et al., 1992). Die Oozyten wurden je mit 1 ng cRNA von  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ENaC und des Kv1.3 bzw. des minK mit oder ohne gleichzeitige Injektion der Kinasen hsgk1, hsgk2 und hsgk3 injiziert. Zweielektroden-Spannungs- und Stromklemme-

20 Experimente konnten 2 bis 4 Tage nach Injektion durchgeführt werden.  $\text{Na}^+$ -Ströme (ENaC) und  $\text{K}^+$ -Ströme (Kv1.3, minK) wurden bei 10 Hz gefiltert und mit einem Schreiber aufgezeichnet. Die Experimente wurden normalerweise am zweiten Tag nach cRNA Injektion durchgeführt. Die Badlösung enthielt: 96 mM NaCl, 2mM KCl, 1.8 mM

25  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , und 5 mM HEPES bei pH 7.5 und bei einem Haltepotential von -80 mV. In allen Experimenten wurde der pH durch Titration mit HCl oder NaOH eingestellt. Die Flußrate der Badflüssigkeit wurde auf 20 ml/min eingestellt, wodurch ein kompletter Lösungswechsel in der Meßkammer innerhalb von 10 bis 15 Sekunden

30 gewährleistet wurde. Alle Daten werden in Form von arithmetischen Mittelwerten  $\pm$  SEM angegeben.

## Ergebnisse

Um die Wirkungen von hsgk1, hsgk2 oder hsgk3 zu untersuchen, wurde die mRNA der jeweiligen Kinase zusammen mit der mRNA des epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ENaC oder des spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanals Kv1.3 bzw. des minK-Kanals in Xenopus-Oozyten injiziert und danach wurde der Amilorid-sensitive Na<sup>+</sup>-Strom ( $I_{Na}$ ) und der spannungs-aktivierte K<sup>+</sup>-Strom ( $I_K$ ) bestimmt. Wie in der folgenden Tabelle 1 sowie in Abb. 1 und 2 gezeigt wird, stimulieren sowohl hsgk2 als auch hsgk3 sowohl die ENaC- als auch die Kv1.3-Aktivität. Die hsgk1 stimuliert die minK-Aktivität (Tabelle 1). Die stimulierende Wirkung wurde durch die Proteinkinase-Inhibitoren Staurosporin und Chelerythrin völlig unterbunden.

15

Tabelle 1:

	keine Kinase	hsgk1	hsgk2	hsgk3	n
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ENaC $I_{Na}$	2,5±0,3	5,9±1,0	9,4±1,7	4,5±0,8	7
Kv1.3 $I_K$	3,1±0,6	8,4±1,8	6,5±0,6	8,2±0,7	7
minK $I_K$	0,67±0,07	1,16±0,11	0,97±0,1	1,1±0,11	7

20 Tabelle 1: Na<sup>+</sup> ( $I_{Na}$ ) und K<sup>+</sup> ( $I_K$ ) -Ströme ( $\mu A$ ) in Oozyten, die mit Wasser (n.i.), mit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ENaC, mit Kv1.3 oder mit minK mit oder ohne hsgk1, hsgk2 oder hsgk3 injiziert wurden.

25

### Experiment 1

Nach Injektion der mRNA von hsgk2 und hsgk3 konnte gezeigt werden (siehe Figur 1), daß der Amilorid-hemmbarer Strom durch den Na<sup>+</sup>-Kanal rENaC (I<sub>Amil</sub>) durch die Coexpression mit hsgk2 und hsgk3 signifikant zunimmt. Die Kinasehemmer Staurosporin und Chelerythrin hemmen die Aktivierung des Na<sup>+</sup>-Kanals (Figur 1). Da die stimulierende Wirkung der hsgk2 und hsgk3 auf den ENaC-Kanal durch die Kinasehemmstoffe Staurosporin und Chelerythrin unterbunden werden kann, kann a) der diagnostische Nachweis einer gestörten Expression oder Funktion der sgk2 oder der sgk3 eine wichtige Maßnahme sein, die Ursache beispielsweise einer vorliegenden Hypertonie aufzudecken und b) der Einsatz der Hemmstoffe der sgk2 und sgk3, wie Staurosporin, Chelerythrin oder weitere Kinasehemmer, bei der Therapie der oben genannten Erkrankung möglich sein.

### Experiment 2

Nach Injektion der mRNA von hsgk1, hsgk2 oder hsgk3 zusammen mit der mRNA der K<sup>+</sup>-Kanäle Kv1.3 oder minK konnte gezeigt werden, daß der Strom durch diese beiden Kanäle (I) gesteigert werden kann (Tabelle 1). Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente nach Injektion der mRNA von hsgk2 und hsgk3 zusammen mit der mRNA von Kv1.3 am ersten Tag (d1, linke Säulen) und am fünften Tag (d5, rechte Säulen). Da die Aktivierung von K<sup>+</sup>-Kanälen zu einer Herabsetzung der neuronalen Erregbarkeit führt, zeigen diese funktionellen Daten, daß die Wirkungen der im Gehirn exprimierten hsgk3 geeignet sind, die Erregbarkeit von Neuronen zu reduzieren. Eine gestörte Expression oder Funktion der sgk3 kann somit Ursache für das Auftreten epileptischer Anfälle sein. Umgekehrt können Stimulatoren der Expression oder Aktivität der sgk3, welche die Bluthirnschranke über-

- 12 -

schreiten, bei epileptischen Anfällen eingesetzt werden. Gleiche Überlegungen gelten bei Stimulation bzw. Inhibierung der Kinasen, insbesondere der hsgk1, zur Beeinflussung gestörter Erregbarkeit des Herzens.

5

### Experiment 3

Gemäss Figur 3 führt der Entzug von fötalem Kälberserum (FCS) in  
10 HEK-Zellen (human embryonic kidney cells; Lewis, M.L. et al. 1984, Phillips, S.G. et al. 1982) zur Abnahme der Zellzahl durch Absterben von Zellen (schwarze Säulen im Vergleich zu den gepunkteten Säulen), wobei die Situation jeweils nach 24 und 48 Stunden dargestellt ist. Die Abnahme wird durch den insulinähnlichen Faktor (IGF1) gemindert  
15 (weiße Säulen). Die Wirkung von IGF1 wird durch gleichzeitige Hemmung von K<sup>+</sup>-Kanälen mit Margatoxin (MT) aufgehoben (schraffierte Säulen). Diese Daten zeigen, daß der insulinähnliche Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor IGF1) seine zelltodhemmende Wirkung verliert, wenn gleichzeitig K<sup>+</sup>-Kanäle gehemmt werden. Die sgk2  
20 und/oder sgk3 vermittelte Aktivierung des Kv1.3-Kanales wirkt demnach antiapoptotisch, und ein Mangel an sgk2 und sgk3 Wirkung würde demnach zu gesteigertem Zelltod, wie etwa bei Neurodegeneration, führen. Umgekehrt können Aktivatoren der sgk2 und sgk3 zur Verhinderung von apoptotischem Zelltod bei Neurodegeneration eingesetzt  
25 werden. Da Kv1.3 zudem eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Lymphozytenproliferation und -funktion spielt, können Hemmstoffe bzw. Aktivatoren der Kinase zur Beeinflussung des Immunsystems z.B. bei Autoimmunerkrankung bzw. bei Immundefizienz eingesetzt werden.

30

**Literatur:**

- Busch AE, Kavanaugh MP, Varum MD, Adelman JP, North RA. Regulation by second messengers of the slowly activating, voltage-  
5 dependent potassium current expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. Lond.* 450: 491-502, 1992.
- Cahalan MD, Chandy KG. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Cur. Opin. Biotech.* 8 (6): 749-756, 1997.
- 10 Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2514-2519, 1999.
- 15 Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem. J.* 344: 189-197, 1999.
- 20 Lang F, Szabo I, Lepple-Wienhues A, Siemen D, Gulbins E. Physiology of receptor mediated lymphocyte apoptosis. *News Physiol. Sci.* 14: 194-200, 1999.
- Lewis, ML, Morrison, DR, Mieszkuc, BJ, Fessler, DL. Problems in the  
25 bioassay of products from cultured HEK cells: plasminogen activator. *Adv Exp Med Biol.* 172: 241-267, 1984.
- Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G. Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct.  
30 Effects on epithelial Na<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 274: 16973-16978, 1999.

- 14 -

Phillips, SG, Lui, SL, Phillips, DM. Binding of epithelial cells to lectin-coated surfaces. *In Vitro* 18: 727-738, 1982.

Pongs O. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels.  
5 *Physiol Rev.* 72: S69-S88, 1992.

Szabo I, Gulbins E, Apfel H, Zhan X, Barth P, Busch AE, Schlottmann K, Pongs O, Lang F. Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K<sup>+</sup>-channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J.*  
10 *Biol. Chem.* 271: 20465-20469, 1996.

Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc.*  
15 *Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4440-4445, 1997.

Warnock DG. Liddle syndrome: An autosomal dominant form of human hypertension. *Kidney Int.* 53 (1): 18-24, 1998.

Webster MK, Goya L, Firestone GL. Immediate-early transcriptional  
20 regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268 (16): 11482-11485, 1993a.

Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene  
25 family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol. Cell. Biol.* 13 (4): 2031-2040, 1993b.

-----

Patentansprüche:

- 5 1. Verwendung einer Substanz zum Nachweis der Expression und/oder Funktion von sgk2 und/oder sgk3 in eukaryotischen Zellen, zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere Natrium- und/oder Kaliumkanälen, in Zusammenhang stehen.
- 10 2. Verwendung eines Wirkstoffs zur Beeinflussung, insbesondere zur Inhibierung oder Aktivierung der Expression und/oder Funktion von sgk2 und/oder sgk3 in eukaryotischen Zellen, zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere Natrium- und/oder Kaliumkanälen, in
- 15 Zusammenhang stehen.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Beeinflussung, insbesondere Inhibierung und Aktivierung, von
- 20 sgk2 und/oder sgk3, eine Beeinflussung und/oder Kontrolle der  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung und/oder  $\text{K}^+$ -Ausscheidung zur Folge hat.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Ionenkanal um
- 25 einen Natriumkanal des ENaC-Subtypes handelt.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Ionenkanal um einen Kaliumkanal des Kv1.3-Subtypes handelt.



- 16 -

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff gegen sgk2 und/oder sgk3 gerichtet ist.
- 5 7. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer von sgk2 und/oder sgk3 gerichtet ist.
- 10 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Kinase-Inhibitor, vorzugsweise Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. deren Analoga, ist.
- 15 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Polynukleotid ist, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid, kodiert, wobei dieses Peptid die Expression von sgk2 und/oder sgk3 beeinflusst, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert.
- 20 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein "small molecular compound", vorzugsweise ein "small molecular compound" mit einem Molekulargewicht (MG) < 1000, ist.
- 25 11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen, die insbesondere mit einer gestörten Aktivität von Natriumkanälen in Zusammenhang stehen, um arterielle Hypertonie oder um ein dem Liddle-Syndrom entsprechendes Krankheitsbild handelt.
- 30

- 17 -

12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen, die insbesondere mit einer gestörten Aktivität von Kaliumkanälen in Zusammenhang stehen, um Epilepsie, Neurodegeneration, Autoimmunerkrankungen oder Immundefizienz handelt.
13. Diagnosekit, umfassend mindestens eine Substanz zum Nachweis von Expression und/oder Funktion von sgk2 und/oder sgk3, zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere Natrium- und/oder Kaliumkanälen in Zusammenhang stehen.
14. Diagnosekit nach Anspruch 13 zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einer Über- und/oder Unterexpression von sgk2 und/oder sgk3 verbunden sind.
15. Diagnosekit nach Anspruch 13 oder Anspruch 14 zur Diagnose von arterieller Hypertonie oder von einem dem Liddle-Syndrom entsprechenden Krankheitsbild.
16. Diagnosekit nach Anspruch 13 oder Anspruch 14 zur Diagnose von Epilepsie, Neurodegeneration, Autoimmunerkrankungen oder Immundefizienz.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines Wirkstoffs, der die Expression und/oder Funktion von sgk2 und/oder sgk3 beeinflusst, insbesondere inhibiert oder aktiviert, und gegebenenfalls einen pharmazeutischen Träger.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Wirkstoff um einen Kinase-

- 18 -

Inhibitor, vorzugsweise Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. deren Analoga, handelt.

- 5 19. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Polynukleotid ist, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid kodiert, wobei dieses Peptid die Expression von *sgk2* und/oder *sgk3* beeinflusst, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert.
- 10 20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein "small molecular compound", vorzugsweise ein "small molecular compound" mit einem Molekulargewicht (MG) < 1000, ist.
- 15 21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 17, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines Wirkstoffs, der die Expression und/oder Funktion von Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischen Vorläufern von *sgk2* und/oder *sgk3* beeinflusst, insbesondere inhibiert oder aktiviert, und  
20 gegebenenenfalls einen pharmazeutischen Träger.
22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Polynukleotid ist, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid kodiert, wobei dieses  
25 Peptid die Expression von Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischen Vorläufern von *sgk2* und/oder *sgk3* beeinflusst, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert.
- 30 23. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein "small molecular compound", vorzugsweise ein "small molecular compound" mit einem Molekulargewicht (MG) < 1000, ist.

Fig. 1

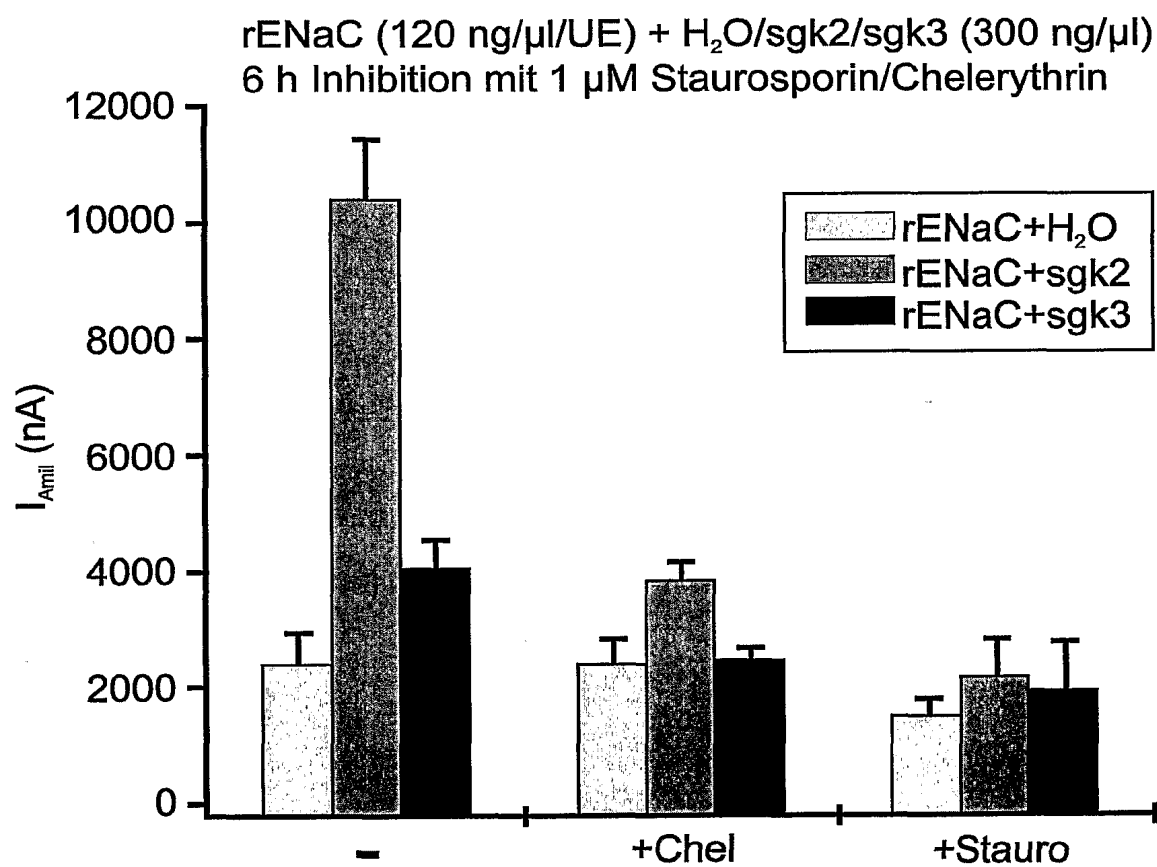


Fig. 2

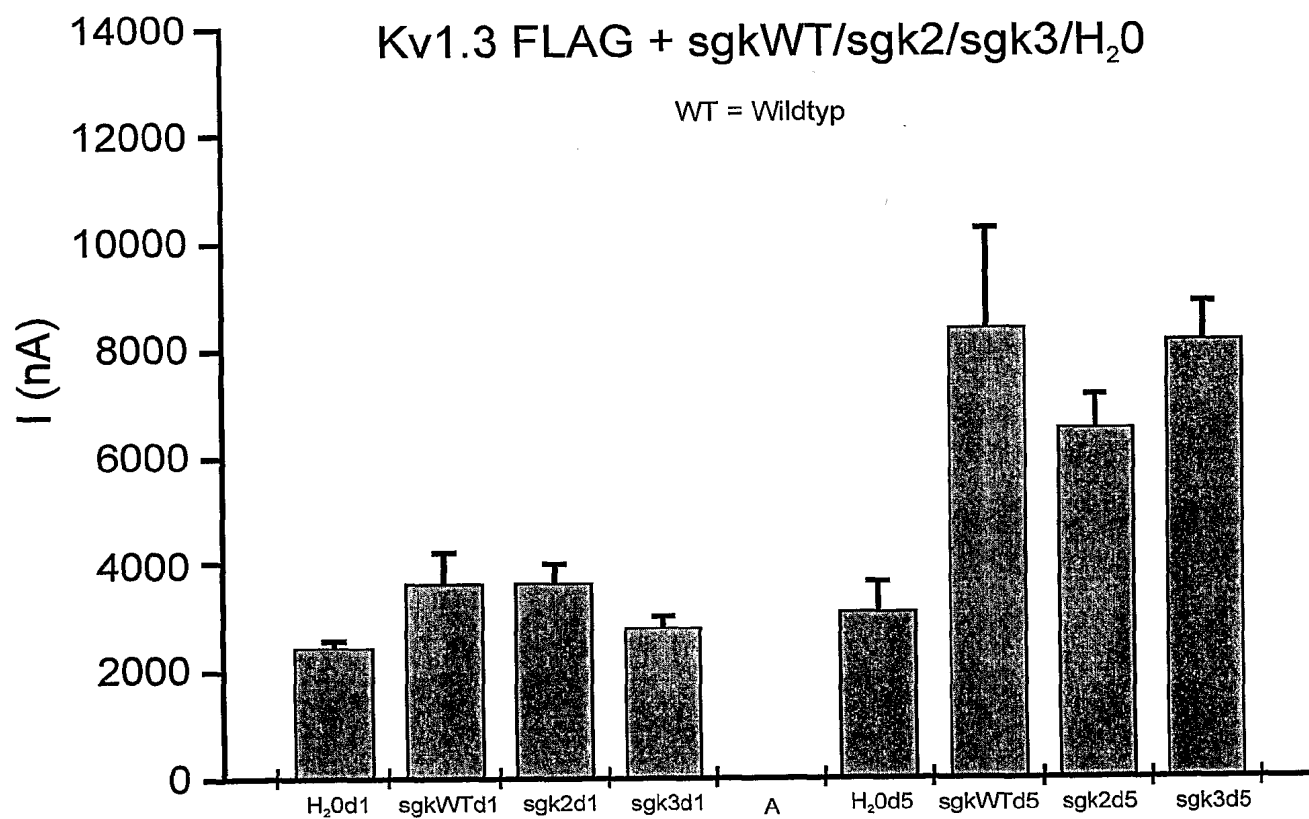


Fig. 3

